



(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2022.08.26

(21) Номер заявки
201892212

(22) Дата подачи заявки
2017.03.14

(51) Int. Cl. **A61K 39/12** (2006.01)
C07K 14/005 (2006.01)

(54) ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ КОМПОЗИЦИЯ, КОТОРАЯ ВКЛЮЧАЕТ ПОВЕРХНОСТНЫЕ И НУКЛЕОКАПСИДНЫЕ АНТИГЕНЫ ВИРУСА ГЕПАТИТА В

(31) 2016-0038

(32) 2016.03.31

(33) CU

(43) 2019.03.29

(86) PCT/CU2017/050001

(87) WO 2017/167317 2017.10.05

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**СЕНТРО ДЕ ИНХЕНЬЕРИЯ
ХЕНЕТИКА И БИОТЕКНОЛОХИЯ
(CU)**

(72) Изобретатель:
**Агилар Рубидо Хулио Сесар, Лобайна
Мато Ядира, Иглесиас Перес Энрике,
Пентон Ариас Эдуардо, Гильен Ньето
Херардо Энрике, Агиар Сантьяго
Хорхе Агустин, Гонсалес Бланко
Сонья, Вальдес Эрнандес Хорхе,
Васкес Кастильо Маризела (CU)**

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(56) BENG TI TEY ET AL: "Optimal conditions for hepatitis B core antigen production in snaked flask fermentation", BIOTECHNOLOGY AND BIOPROCESS ENGINEERING, vol. 9, no. 5, 1° de octubre de 2004 (01.10.2004) paginas 374-378, XP055385266 KR ISSN: 1226-8372, DOI: 10.1007/BF02933060 todo el documento ver en especial el resumen; pág. 375, col. 1, 2° párra.; Fig. 1
DANIEL O PALENZUELA ET AL: "Purification of the Recombinant Hepatitis B Core Antigen, and Its Potential Use for the Diagnosis of Hepatitis B Virus Infection", BIOTECNOLOGÍA APLICADA, vol. 19, no. 3-4, 1° de enero de 2002 (01.01.2002) 138-142, XP055385221, CU ISSN: 0864-4551 todo el documento ver en especial el resumen; pág. 139, col. 1, párra. 4

Y LOBAINA ET AL: "Comparison of the immune response induced in mice by five commercial vaccines based on recombinant HBsAg from different sources, implications on their therapeutic use", BIOTECNOLOGIA APLICADA, vol. 25, no. 4, 1° de enero de 2008 (01.01.2008), páginas

325-331, XP055385126, CU ISSN: 0864-4551 citado en la solicitud todo el documento ver en especial el resumen; pág. 326, columna 2, 2° párra.; pág. 330

AGUILAR J C ET AL: "Development of a nasal vaccine for chronic hepatitis B infection that uses the ability of hepatitis B core antigen to stimulate a strong Th1 response against hepatitis B surface antigen", IMMUNOLOGY AND CELL BIOLOGY, CARLTON, AU, vol. 82, no. 5, 1° de octubre de 2004 (01.10.2004), páginas 539-546, XP002354413, ISSN: 0818-9641, DOI: 10.1111/J.0818-9641.2004.01278.X citado en la solicitud todo el documento ver en especial el resumen; pág. 5406, columna 1, párra. 2-4

BETANCOURT ET AL: "Phase I clinical trial in healthy adults of a nasal vaccine candidate containing recombinant hepatitis B surface and core antigens", INTERNATIONAL JOURNAL OF INFECTIOUS DISEASES, INTERNATIONAL SOCIETY FOR INFECTIOUS DISEASES, HAMILTON, CA, vol. 11, no. 5, 14 de agosto de 2007 (14.08.2007), páginas 394-401, XP022200686, ISSN: 1201-9712, DOI: 10.1016/J.IJID.2006.09.010 todo el documento ver en especial el resumen; pág. 399, col. 1, párra. 4 y col. 2, último párra.

EP-A1-2484343

RIEDEL P ET AL: "Priming Th1 immunity to viral core particles is facilitated by trace amounts of RNA bound to its arginine-rich domain", THE JOURNAL OF IMMUNOLOGY, THE AMERICAN ASSOCIATION OF IMMUNOLOGISTS, US, vol. 168, no. 10, 15 de mayo de 2002 (15.05.2002), páginas 4951-4959, XP002354381, ISSN: 0022-1767 todo el documento ver en especial el resumen; pág. 4953-4, pág. 4955, col. 2, párra 2; pág. 4956, col. 2, párra. 2; pág. 4958, párra. 1

SCHEEL BIRGIT ET AL: "Immunostimulating capacities of stabilized RNA molecules", EUROPEAN JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol. 34, no. 2, 1° de enero de 2004 (01.01.2004), páginas 537-547, XP002422103, ISSN: 0014-2980, DOI:10.1002/EJ.200324198 todo el documento ver en especial el resumen, pág. 538, párra. entre la col 1 y 2

Julio César Aguilar Rubido: "Efecto adyuvante de los antígenos de la superficie y la nucleocapsida del virus de la hepatitis B y su utilidad en el desarrollo de candidatos vacunales.", 1° de enero de 2007 (01.01.2007), XP055385300, recuperado de internet:URL: http://tesis.repo.sld.cu/218/1/Aguilar_Rubido.pdf [recuperado el 26 de junio de 2017 (26.06.2017)] ver pág. 25-26, pág. 86-87, 94

(57) В изобретении раскрыта фармацевтическая композиция, которая включает поверхностный антиген (HBsAg) вируса гепатита В (ВГВ) и антиген нуклеокапсида (или ядра, НВсАг) этого вируса. НВсАг в этой композиции содержит матричную рибонуклеиновую кислоту (мРНК) в процентной

доле больше 45% от общего количества рибонуклеиновой кислоты (РНК) в данном антигене. В результате изменений состава антигенов, входящих в ее состав, композиция согласно изобретению может использоваться для профилактики или лечения хронического гепатита В. Изобретение также охватывает применение этой фармацевтической композиции в получении лекарственного средства для иммунопрофилактики или иммунотерапии против инфекции ВГВ и ее применение для усиления иммунного ответа против дополнительного антигена, который совместно вводят со смесью этих антигенов.

040981 B1

040981 B1

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к области медицины, в частности к области вакцинологии, в частности к разработке вакцинных композиций с повышенной эффективностью. Эти композиции включают антигены вируса гепатита В (ВГВ), которые имеют модификации в своем химическом составе, что неожиданно повысило их иммуногенность. Антигенами ВГВ, которые модифицировали по их химическому составу, являлись поверхностный антиген (НВsАg) и ядерный антиген (НВсАg).

Уровень техники

Согласно данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), около трети населения мира инфицировано вирусом гепатита В, что основано на присутствии серологических маркеров инфекции. По оценкам примерно у 5-10% взрослых и до 90% новорожденных, инфицированных ВГВ, развивается хронический гепатит В (НВС). В настоящее время 350 миллионов человек имеют персистентную или хроническую инфекцию. Устойчивая репликация вируса в течение длительного времени приводит к воспалительному процессу в печени, что приводит к гибели 25% инфицированной популяции вследствие цирроза, гепатоцеллюлярной карциномы или других осложнений, таких как асцит, кровотечения из пищевода и спленомегалия. Несмотря на общую вакцинацию новорожденных и младенцев в последние годы и на последующее снижение числа новых случаев заражения НВС, НВС по-прежнему является серьезной проблемой здравоохранения во всем мире [Hilleman, M.R. Вакцина (2001), 19, 1837-48].

Лечение интерфероном-альфа (IFN- α), его пегилированным вариантом (ПЭГ-IFN), а также нуклеотидными и нуклеозидными аналогами, такими как тенофовир, энтекавир, ламивудин, адефовир дипивоксил и тельбивудин, представляет собой современный стандарт лечения ХГВ. В целом эти лекарственные средства имеют низкую эффективность в отношении устойчивой элиминации ВГВ после лечения, при этом их применение связано с серьезными неблагоприятными явлениями (AD), что широко известно [Nash K. Adv Ther (2009), 26:155-169; Yang N, Hepatol Int. 2015 Sep 12. [электронная публикация до выхода в печать] PubMed PMID: 26363922].

Использование вакцинных композиций в качестве иммунотерапевтической стратегии при лечении ХГВ представляет собой интересный подход. Вирусную персистенцию связывали с нарушением развития клеточного иммунитета против ВГВ. С начала 1980-х годов стратегии вакцинации были направлены на увеличение и усиление слабого ответа Т-клеток у больных ХГВ. В таких иммунотерапевтических стратегиях первоначально применяли коммерческие вакцины против ВГВ с целью индукции специфических CD4+ и CD8+ ответов против ВГВ, а также провоспалительных цитокинов для контроля репликации вируса. Таким образом, почти все коммерческие профилактические вакцины исследовали отдельно или в комбинации с традиционными противовирусными терапиями. В предыдущих исследованиях терапевтической вакцинации вакцины применяли с другими противовирусными терапиями или без них. Кроме того, иммунотерапия с применением коммерческих вакцин также предоставила схемы с большими количествами прививок, при этом исследовали альтернативные парентеральные пути. Основные исследования кратко описаны ниже.

Экспериментальное исследование вакцинации у больных ХГВ с применением Genhevac B® (Aventis Pasteur, France, получена в клетках млекопитающих -СНО) продемонстрировало снижение репликации ВГВ у приблизительно 50% хронических носителей [Pol S, et al., C R Acad Sci III (1993), 316:688-91]. В другом многоцентровом плацебо-контролируемом исследовании также провели оценку вакцины Genhevac B®, вакцины Recombivax® (Merck Sharp Dohme-Chibret, France, полученной в дрожжах). При этом значимое отличие наблюдали в шестой месяц (3, 20 и 22%) между группами, получавшими Genhevac® и Recombivax®, соответственно. Однако к 12 месяцу отличие исчезло [Pol S, J Hepatol (2001); 34:917-21]. В результате пришли к выводу, что явное положительное действие отсутствовало, и антиген pre-S2, присутствующий в вакцине Genhevac®, по-видимому, не оказывал какого-либо дополнительного эффекта.

Другие исследования, в которых оценивали терапевтическую вакцину Genhevac® [Yalcin K, et al. Infection (2003), 31:221-225; Dikici B, et al., J Gastroenterol Hepatol (2003), 18 (2):218-22] показал лишь небольшую эффективность, связанную с лечением.

Нерагене® (Medeva Ltd., UK), полученная в СНО вакцина, включает три варианта НВsАg (L, S и М), и их результаты на здоровых добровольцах и нереспондерах продемонстрировали высокий уровень иммуногенности [Page M, et al., Intervirology (2001), 44:88-97; Yap I, et al., Ann Acad Med Singapore (1996), 25: 120-122; Zuckerman JN, et al., BMJ (1997), 314: 329; Jones CD, et al., Vaccine (1999), 17 (20-21): 2528-37]. Принимая это во внимание, проводили исследование для оценки его терапевтического потенциала. Восемь доз по 20 мкг вакцины вводили в двух курсах из 4 прививок, с 5-месячным интервалом между ними [Carman WF, et al., J Hepatol (2001); 34:917-921]. В конце схемы, 8 из 22 пациентов, которые прошли схему, имели длительное отсутствие вируса гепатита В, а у 7 пациентов был устранен НВсАg. Это неконтролируемое ограниченное исследование сопровождалось контролируемым исследованием с большим количеством пациентов. В этом втором клиническом исследовании, включавшим 103 хронических больных, которые были НВсАg положительными, четыре дозы вакцины или плацебо вводили с интервалами в один и 8 месяцев, а затем все пациенты получали 8 дополнительных доз с одномесячными

интервалами. В конце лечения не было получено никаких значимых положительных клинических результатов [Medeva PLC <http://www.investigate.co.uk/article.aspx?id=200001171532169093D> (консультации 20 октября 2015 года)].

Чтобы способствовать развитию противовирусного иммунного ответа, использовали методы лечения, объединяющие в себе терапевтическую вакцинацию со стандартными противовирусными терапиями. Такая стратегия учитывает результат, связанный с действием ламивудина, который увеличивает содержание специфических ВГВ Т-клеток в периферической крови в результате ингибирования репликации вируса [Bertoletti A et al., *Expert Rev Gastroenterol Hepatol* (2009), 3(5):561-9].

Комбинированная стратегия противовирусной вакцинации должна способствовать большей реактивности Т-клеточного ответа против ВГВ, но должна считаться более безопасной, поскольку она должна исключать поражение печени вследствие активации иммунной системы. Однако нет никаких подтверждений того, что активация специфического иммунного ответа вакциной у больных ХГВ может вызывать фюльминантный гепатит.

В исследовании, опубликованном в 2002 году, оценивали внутривенное введение (в/к) вакцины Энджерикс В® (GlaxoSmithKline) с ламивудином [Dahmen A, et al., *J Med Virol* 2002; 66:452-60] у больных ХГВ. Шесть доз Энджерикс В® вводили один раз в месяц в комбинации с ежедневным введением ламивудина. Дополнительная группа получала такое же лечение в сочетании с ежедневным подкожным (п/к) введением интерлейкина-2 (IL-2). После завершения терапии, у 7 из 9 пациентов в первой группе и у 2 из 5 пациентов во второй группе вирусная нагрузка уменьшилась до не поддающихся определению уровней. У четырех респондеров вирус был устранен, и нормализовались уровни трансаминаз. В другом клиническом исследовании комбинацию терапевтической вакцинации в/к путем оценивали при использовании вакцины, содержащей HBsAg в алюмокалиевых квасцах, с ежедневным введением ламивудина в течение одного года [Horiike N, et al., *J Clin Virol* (2005), 32:156-161]. Эти исследования показали, что комбинированная терапия эффективна и имеет мало осложнений у больных ХГВ. Однако в обоих случаях использовали в/к путь, который может способствовать иммуногенности вакцины.

Тот же поверхностный антиген, включенный в активный адъювант, неэффективен при комбинированной терапии ламивудином, что указывает на то, что влияние пути иммунизации не следует игнорировать, и что это, возможно, решающий фактор, определяющий будущее вакцинации.

Исследование, которое завершило длительный период клинической оценки кандидатных вакцин для подавления вирусной нагрузки, представлено в отчете Vandepapeliere с соавт. [Vandepapeliere P, et al., *Vaccine* (2007) Dec 12; 25(51):8585-97]. В этом исследовании проводили клиническую оценку кандидатной вакцины на основе композиции адсорбированного HBsAg, вводимой внутримышечным (в/м) путем в дозе 100 г HBsAg, в сочетании с масляным адъювантом и мощными иммуномодуляторами, такими как монофосфорилипид А и сапонин QS21. Десять введений в условиях пониженной вирусной нагрузки не продемонстрировали никаких преимуществ по отношению к вирусологическому ответу, по сравнению с контрольной группой, которая получала только противовирусный препарат.

Накопленные знания о характеристиках иммунного ответа хозяина и о терапевтическом применении обычных вакцин показывают, что стратегии, направленные на индукцию сильной и долговременной реактивности Т-клеток против антигенов ВГВ, возможны и дают надежду на успешное лечение больных ХГВ.

Отсутствие иммунной стимуляции против нуклеокапсидных антигенов, вероятно, является основным иммунологическим маркером неэффективности терапевтической вакцинации на основе HBsAg. Фактически, цель терапевтической вакцинации при ХГВ заключается в активации тех же природных иммунных механизмов, которые преобладают во время острого гепатита В и которые является самоконтролируемым, или при ХГВ, который подвергается сероконверсии. Если иммунотерапия не стимулирует такие иммунные ответы, она, вероятно, не сможет вызвать сероконверсию.

Улучшение композиций с точки зрения стратегии антигенной селекции и вакцинации может стать способом преодоления таких трудностей. Характеристики белков оболочки оправдывают их включение в терапевтическую вакцину. Фактически, белки оболочки содержат многочисленные эпитопы В и Т-клеток [Penna A, et al., *J Virol* (1992), 66 (2):1193-6; Nayersina R, et al., *J Immunol* (1993), 150:4659-71], и предполагается, что антитела против белков оболочки играют важную роль в подавлении вируса, устраняя свободные вирусные частицы из кровотока и предотвращая повторное инфицирование восприимчивых клеток. С другой стороны, высокие уровни HBsAg циркулируют в сыворотке больных ХГВ, этот факт может играть главную роль в поддержании иммунной толерантности, в результате истощения Т-клеток и подавления продукции антител против HBs [Nagaraju K, et al., *J Viral Hepat* (1997), 4:221-30].

В этом направлении HBcAg был предложен в качестве основного кандидатного антигена для включения в терапевтическую вакцину для ХГВ. Во время острого саморазрешающегося гепатита эпитопный ответ Т-клеток предпочтителен и преобладает в ходе сероконверсии при спонтанном или вызванном лечением ХГВ [Ferrari C, et al., *J Clin Invest* (1991), 88:214-22; Marinos G, et al., *Hepatology* (1995), 22:1040-9; Tsai SL, et al., *Clin Invest* (1992), 89:87-96].

До сих пор ни одна из коммерческих вакцин против гепатита В не продемонстрировала достаточ-

ные клинические результаты, которые позволяют им конкурировать с существующими методами лечения или просто вызовут одобрение их внедрения в медицинскую практику. Тем не менее, эти вакцины дали большие надежды в области лечения, не только в отношении иммунотерапии против гепатита В, но также и для других патологий, таких как инфекция, вызванная вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ), и рак, среди прочих хронических заболеваний, передающихся или непердающихся. Таким образом, эта стратегия требует клинической оценки новых концепций вакцин и оптимизации всех связанных факторов. В связи с этим кандидатная терапевтическая вакцина, включающая НВсАг, помимо НВsАг, является результатом разработки таких стратегий иммунотерапии.

Центр геной инженерии и биотехнологии Кубы (CIGB) производит НВsАг в виде рекомбинантного белка, получаемого в дрожжах *Pichia pastoris* в качестве хозяина. Этот антиген был включен в профилактическую вакцину Heberbiovac HB® с начала 1990-х годов [Muzio V, et al., *Biotecnologia Aplicada* (2001) 18; 103-104; ul-Haq N, et al., *Vaccine* (2003) 21:3179-85].

Кроме того, в CIGB разработали композицию, которая обеспечивает длительный иммунный ответ против гепатита В, указанная композиция включает в качестве основных компонентов НВsАг и НВсАг, антигены вводят через слизистую оболочку с развитием системного и мукозального ответа [Европейский патент EP 1136077]. В другом патентном документе центра CIGB описана генерация агрегированных антигенных структур, образующих частицы. В этом документе показано, что агрегация, делипидизация или окисление, а также отбор частиц 30-500 нм и включение таких агрегатов в подходящий адъювант способствует иммуногенности полученного антигенного препарата [Европейский патент EP 1346727]. Объединив стратегии, предложенные в обоих патентных документах, в CIGB разработали кандидатную терапевтическую вакцину под названием NASVAC [Lobaina Y, et al., *Mol Immunol* (2015), 63:320-327], которую вводят с применением комбинации путей иммунизации. Клинические результаты вакцинации крайне перспективны, однако эффективность продукта необходимо повысить с применением более сильных иммуногенов.

Стратегии вакцинации, которые включают основные антигены ВГВ, такие как НВsАг и НВсАг, привели к появлению композиций, обладающих некоторой противовирусной эффективностью. Однако их улучшение необходимо для увеличения числа пациентов с длительным противовирусным ответом, а также числа пациентов, у которых наблюдается сероконверсия НВsАг в анти-НВsАг.

Описание изобретения

Изобретение помогает решить вышеуказанную проблему путем разработки фармацевтической композиции, которая характеризуется: 1) антигеном НВсАг, который включает матричную рибонуклеиновую кислоту (мРНК) в процентной доле более 45% от общего количества рибонуклеиновой кислоты (РНК) указанного антигена, и 2) антигеном НВsАг HBV. В варианте осуществления изобретения фармацевтическая композиция содержит НВsАг, содержащий фосфатидилсерин в процентной доле более 5% от общего количества фосфолипидов, формирующих указанный антиген.

Включение антигенов НВsАг и НВсАг, которые были модифицированы по своему химическому составу таким определенным способом, способствует иммунологическим и противовирусным свойствам этой композиции для иммунотерапии. Однако вышеуказанные модификации не влияют на белковый состав антигенов НВsАг и НВсАг изобретения, так как их первичная, вторичная и третичная структуры остаются идентичными по сравнению с их немодифицированными вариантами. Тем не менее, такие модификации приводят к неожиданным свойствам этих антигенов, что дает более сильные иммуногены. Кроме того, комбинация таких модифицированных антигенов приводит к получению композиции с более высокой терапевтической противовирусной эффективностью для лечения ХГВ.

В изобретении НВсАг был получен с мРНК на уровне более 45%. В конкретном случае этот модифицированный антиген был получен благодаря комбинации изменений параметров его процесса ферментации. В этом случае применение химически определенной среды и низкой удельной скорости роста обеспечивает получение варианта НВсАг, где доля мРНК увеличена по сравнению с остальной РНК, присутствующей в нем.

Хотя была описана высокая иммуногенность НВсАг, полученного в *Escherichia coli*, как и участие компонента нуклеиновых кислот в иммуногенности полноразмерных антигенов (183 аминокислот) в форме частиц, до настоящего изобретения относительный эффект каждого варианта РНК был неизвестен в отношении их определенного вклада в конечную иммуногенность НВсАг. Неожиданно было обнаружено, что НВсАг с уровнем мРНК выше 45% был более иммуногенным и вызывал развитие более сильного ответа Th1 по сравнению с немодифицированным НВсАг.

Изменения процентной доли обнаруженной мРНК не влияли на содержание суммарной РНК, присутствующей в частице, относительно содержания белка. Неожиданно было обнаружено, что НВсАг, содержащий больше 45% мРНК в суммарной РНК, обладал более высокой иммуногенностью по сравнению с НВсАг, полученным без какого-либо изменения содержания мРНК. Такое увеличение иммуногенности включало значительное увеличение цитокинов Th1 и повышенную способность к устранению циркулирующего НВsАг после иммунизации трансгенных мышей и пациентов с ХГВ.

С другой стороны, в настоящем изобретении оценивали НВsАг, который содержит фосфатидилсерин на уровне больше 5% от общего количества фосфолипидов, присутствующих в этом липопротеино-

вом антигене. В частности, увеличение процентной доли фосфатидилсерина более чем до 5% от общего количества фосфолипидов было продемонстрировано в отношении изменения таких параметров, как увеличение концентраций кальция и магния в среде ферментации, низкой удельной скорости роста и низкого pH. Однако изобретение не было ограничено HBsAg, полученным при таких условиях. Увеличение процентной доли фосфатидилсерина более чем до 5% связывали с увеличением иммуногенности полученного в результате антигена при сравнении его с HBsAg с более низким содержанием этого фосфолипида. Наблюдали значительное повышение цитокинов Th1, а также более высокую способность устранения циркулирующего HBsAg после иммунизации HBsAg трансгенных мышей и больных ХГВ при использовании HBsAg, содержащего больше 5% фосфатидилсерина относительно общего % фосфолипидов.

В настоящем изобретении особым образом модифицированные антигены HBsAg и HBcAg были выбраны на основе более высокой интенсивности иммунного и противовирусного ответа в сравнении с композициями, в которых использовались немодифицированные антигены. Кроме того, композиция, содержащая оба антигена, могла вызывать сероконверсию HBsAg в анти-HBsAg у большего числа пациентов по сравнению с антигенами, которые вводили отдельно, что демонстрирует важность и функциональность модификаций, обнаруженных в антигенах, являющихся частью композиции настоящего изобретения, а также превосходство комбинированных композиций по сравнению с отдельными антигенами.

В настоящем изобретении предложено новое решение проблемы, существующей в уровне техники, связанной с необходимостью новых композиций, которые позволяют усилить иммунный ответ против HBsAg и против HBcAg, для создания более эффективных способов лечения для контроля хронической инфекции, вызванной ВГВ. Объект настоящего изобретения не может считаться очевидным или полученным из уровня техники специалистами, поскольку он является результатом идентификации новых характеристик описанных антигенов. Хотя такие модифицированные антигены сохраняют свой белковый состав, они различаются по химическому составу молекул, связанных с ними.

Таким образом, в рамках изобретения модифицированный HBcAg является препаратом из HBcAg, который включает мРНК в процентной доле более 45% от суммарной РНК данного антигена. В то же время, модифицированный HBsAg является препаратом HBsAg, который содержит фосфатидилсерин в процентной доле более 5% от общего количества фосфолипидов данного антигена.

В одном варианте осуществления изобретения композиция, содержащая антиген HBcAg с мРНК в процентной доле более 45% от суммарной РНК данного антигена и антиген HBsAg ВГВ, отличается тем, что она изготовлена для введения парентеральным и мукозальным путями. Для введения композиции согласно изобретению мукозальным путем и, в частности, назальным путем могут применяться устройства, которые были разработаны и/или выпущены в продажу для введения фармацевтических композиций таким путем.

В конкретном варианте осуществления указанная композиция дополнительно отличается тем, что она содержит вакцинный адъювант. Среди вакцинных адъювантов, которые могут присутствовать в композиции согласно изобретению, были обнаружены, например, такие, которые хорошо известны специалистам в этой отрасли, такие как соли алюминия, эмульсии "вода в масле", разработанные для медицинского применения, стимуляторы иммунной системы и т.д.

Кроме того, изобретение относится к применению антигена HBcAg, который включает мРНК в процентной доле более 45% от суммарной РНК данного антигена, и антигена HBsAg для производства лекарственного средства для иммунопрофилактики или иммунотерапии против инфекции, вызванной ВГВ. В одном варианте осуществления изобретения, HBsAg, входящий в состав указанного лекарственного средства, содержит фосфатидилсерин в процентной доле более 5% от общего количества фосфолипидов данного антигена. В конкретном варианте осуществления указанное лекарственное средство изготовлено для введения парентеральным и мукозальным путем. В предпочтительном варианте осуществления лекарственное средство с HBcAg, содержащим мРНК в процентной доле более 45% от суммарной РНК данного антигена, и антигеном HBsAg, применяют для лечения больных ХГВ или больных с коинфекциями, где одним из инфицирующих вирусов является ВГВ. Кроме того, при лечении больных ХГВ указанным лекарственным средством применение направлено на предотвращение гепатоцеллюлярного рака, возникшего в результате инфекции, вызванной ВГВ.

В случае когда лекарственное средство, содержащее HBcAg с процентной долей мРНК более 45% от суммарной РНК данного антигена и антиген HBsAg, применяется для лечения больных ХГВ путем иммунотерапии, ее можно проводить активным способом (путем иммунизации пациентов этим лекарственным средством) или в пассивной форме, путем клеточной стимуляции. Благодаря своим компонентам фармацевтическая композиция по изобретению может применяться для стимуляции аутологичных или гетерологичных клеток. Таким образом, в изобретении предложен способ клеточной стимуляции с применением указанной композиции и последующей пассивной иммунизации больных ХГВ на основе максимальной стимуляции, *in vivo* или *in vitro*, аутологичных или гетерологичных клеток, которые включают дендритные клетки, В-клетки и макрофаги.

Кроме того, в настоящем изобретении раскрыт способ иммунопрофилактики или иммунотерапии

против ВГВ-инфекции, который отличается введением пациенту, нуждающемуся в этом, эффективного количества фармацевтической композиции, включающей антиген НВсАg, который содержит мРНК в процентной доле более 45% от суммарной РНК данного антигена, и НВсАg антиген ВГВ. В одном варианте осуществления изобретения НВсАg включает фосфатидилсерин в процентной доле более 5% от общего количества фосфолипидов данного антигена. В варианте осуществления изобретения указанную фармацевтическую композицию вводят парентеральным и мукозальным путями. В предпочтительном варианте осуществления пациент, получающий иммунотерапию, является больным ХГВ. В этом случае применение способа согласно изобретению для иммунотерапии у больных ХГВ обеспечивает предотвращение гепатоцеллюлярного рака, возникшего в результате инфекции, вызванной ВГВ.

Цель настоящего изобретения также состоит в применении НВсАg антигена, который содержит мРНК в процентной доле больше 45% от суммарной РНК данного антигена, и антигена НВсАg для усиления иммунного ответа против дополнительного антигена, который совместно вводят со смесью этих антигенов. В варианте осуществления изобретения НВсАg, входящий в состав смеси антигенов, содержит фосфатидилсерин в процентной доле более 5% от общего количества фосфолипидов данного антигена.

Смесь антигенов, указанных выше, может применяться в потенцировании иммунного ответа против ХГВ (в терапевтической схеме) или в соответствии со стратегиями профилактической вакцинации, где вакцина является поливалентной. Это обусловлено тем, что в дополнение к повышению иммуногенности антигенов НВсАg и НВсАg, измененных определенным способом, можно было проверить, что они способны вызвать эффект потенцирования иммуногенности гетерологичных антигенов. Результаты экспериментальных оценок демонстрируют, что эти антигены, присутствующие в поливалентных композициях, могут использоваться в профилактическом или терапевтическом применении.

Хотя в отношении композиций в настоящем изобретении можно исключить применение адъювантов, стабилизаторов, консервантов или других добавок, это не ограничивает введение добавок, вспомогательных веществ, разбавителей, которые не снижают иммуногенность композиции или получаемого конечного продукта, или противовирусную эффективность вводимой композиции.

С использованием фармацевтической композиции и способа иммунопрофилактики или иммунотерапии согласно изобретению достигается длительный противовирусный ответ, при этом число пациентов с сероконверсией НВсАg в анти-НВсАg увеличивается по сравнению с применением композиций и способов, известных в данной области техники.

Краткое описание фигур

Фиг. 1 - продукция антител IgG против НВсАg после введения двух доз.

Фиг. 2 - антитела IgG против CR3.

Фиг. 3 - пролиферативный ответ CD8+ CR3 (ВИЧ-1)-специфических Т-клеток.

Подробное описание вариантов осуществления/примеров осуществления

Пример 1. Получение белка НВсАg с различными процентными долями вариантов НВсАg.

НВсАg получали из штамма *E. coli*, который генетически трансформировали плазмидой, которая несла ген, кодирующий этот антиген [Aguilar JC, et al., *Immunol Cell Biol* (2004) 82:539-46].

При исследовании частиц НВсАg, полученных в результате ферментативного процесса, проводимого в различные периоды времени, наблюдали увеличение доли мРНК, включаемой в препараты НВсАg, полученные при более длительных периодах ферментации. После 20 ч ферментации уровни мРНК в антигене возросли более чем на 20% по сравнению с НВсАg, полученным в процессах продолжительностью до 14 ч, как показано в табл. 1. Никаких существенных изменений в содержании суммарной РНК в частице не обнаружили, поскольку не было обнаружено значимых различий в уровнях суммарной РНК или в отношении содержания РНК/содержания белка. Однако наблюдали значительное увеличение уровня мРНК по сравнению с другими вариантами, в частности рибосомной РНК (рРНК), которая показала снижение своего содержания с повышением мРНК. Никаких других значимых изменений не было обнаружено в отношении связанных с НВсАg минорных компонентов или характерных контаминирующих примесей при исследовании с помощью масс-спектрометрии или других химических и физических анализов.

Таблица 1. Изменение процентного содержания относительно основных типов РНК в НВсАg в зависимости от длительности процесса ферментации

Вариант	тРНК (%)	рРНК (%)	мРНК (%)
1 (10 ч)	0,1	76,3	23,6
2 (12 ч)	0,1	60,0	39,9
3 (14 ч)	0,09	54,9	45,0
4 (16 ч)	0,09	40,0	59,1 (*)
5 (18 ч)	0,1	34,5	65,5 (*)
6 (20 ч)	0,1	32,8	67,1 (*)

Результаты представляют собой средние значения из пяти измерений. В столбце с названием "Вариант" продолжительность ферментации указана в круглых скобках. тРНК: транспортная РНК, рРНК:

рибосомная РНК и мРНК: матричная РНК. (*): значимое различие ($p < 0,05$).

Оценка на мышцах Balb/c иммуногенности вариантов НВсАг с различным процентным содержанием мРНК.

После получения различных вариантов НВсАг с различным процентным содержанием мРНК в частице (табл. 1), иммунологические оценки этих препаратов выполняли на мышцах Balb/c. Для этого исследования использовали самок мышей возрастом 8-12 недель, сделав две иммунизации в дни 0 и 15, п/к путем, с дозой 1 мкг НВсАг в фосфатно-солевом буфере (PBS), вводимой в конечном объеме 100 мкл. Подробное описание схемы показано в табл. 2.

Таблица 2. Схема иммунизации для оценки влияния процентного содержания мРНК в частице НВсАг на иммуногенность этого антигена

Группа	Лечение	Кол-во животных
1	1 мкг НВсАг (23% мРНК)	10
2	1 мкг НВсАг (39% мРНК)	10
3	1 мкг НВсАг (45% мРНК)	10
4	1 мкг НВсАг (60% мРНК)	10
5	1 мкг НВсАг (65% мРНК)	10
6	1 мкг НВсАг (67% мРНК)	10
7	PBS 1x	10

Забор крови для оценки продукции специфических антител в результате иммунизации проводили через 10 дней после введения второй дозы. Измерение продукции антител против НВсАг проводили с помощью методики ИФА.

Как показано на фиг. 1, на которой представлены титры антител IgG против НВсАг, полученные в каждой исследуемой группе, продукция IgG против НВсАг была значительно выше в группах, получавших НВсАг с содержанием мРНК выше 45% (группы 3-6 в табл. 2). Между группами 3, 4, 5 и 6 не было обнаружено значимых различий, хотя наблюдали некоторую тенденцию к увеличению ответа IgG, связанному с увеличением процента содержания мРНК. Результаты показывают, что увеличение процентной доли мРНК, содержащейся в частице НВсАг на уровнях выше 45% по отношению к суммарному содержанию РНК, придает этому белку более высокую гуморальную иммуногенность. Предварительные анализы структуры субклассов IgG указывают на аналогичную активность на уровне иммунного ответа клеточного типа.

Пример 2. Получение вирусоподобных частиц (VLP) НВсАг с различными процентными долями фосфатидилсерина.

Рекомбинантный НВсАг получали из штамма генетически трансформированных *P. pastoris* при использовании гена, который кодирует этот антиген [европейский патент EP 480525]. Как известно, НВсАг, экспрессируемый в дрожжах этого вида, содержит фосфатидилсерин в своих структурных липидах [Lobaina Y, et al., *Biotecnologia Aplicada* (2008), 25:325-331]. Однако до настоящего изобретения влияние присутствия данного липида на иммуногенность этого антигена не было изучено.

С целью исследования того, как процентная доля фосфатидилсерина влияет на иммуногенность НВсАг, получали препараты указанных VLP при различных условиях ферментации. Во время культивирования в ферментерах для рекомбинантных дрожжей повышали концентрацию $Mg^{(2+)}$ в среде культивирования до процентного содержания 1,0-2,0%, что приводило к увеличению указанного фосфолипида, связанного с VLP НВсАг. Это было обнаружено с помощью тонкослойной хроматографии в ходе исследования НВсАг, полученного при разных условиях роста.

Фосфатидилсерин связан с VLP НВсАг, что характерно для липида. Результаты, показанные в табл. 3, представляют собой средние значения из пяти разных повторностей. Очистка была аналогичной для всех препаратов НВсАг, полученных при различных экспериментальных условиях. Как можно видеть из таблицы, фосфатидилсерин не было обнаружен в образцах, полученных при ферментации с культуральной средой, содержащей концентрацию $Mg^{(2+)}$ ниже 1,2%. Уровни фосфатидилсерина, обнаруженные в препарате, полученном с культуральной средой, содержащей 2,0% $Mg^{(2+)}$, были значительно выше уровней, обнаруженных в препарате, полученном с культуральной средой, содержащей 1,4% $Mg^{(2+)}$ (вариант С).

Таблица 3. Получение вариантов HBsAg с повышающимся количеством фосфатидилсерина

Вариант	Концентрация Mg ⁽²⁺⁾ (%)	ФС (%)
A	1,0	ND
B	1,2	ND
C	1,4	2,5±0,3
D	1,6	5,0±0,4 (*)
E	1,8	6,1±0,4 (*)
F	2,0	7,7±0,5 (**)

ND: не обнаружен, Mg⁽²⁺⁾ (%): концентрация иона Mg (в процентах), обнаруженная в солевых добавках среду культивирования,

ФС (%): процент фосфатидилсерина от общего содержания фосфолипидов, определенный после выделения очищенного HBsAg,

(*): значимые различия (p<0,05),

(**): высокосignificant различия (p<0,01).

Препараты HBsAg, представленные в табл. 3, были идентичны по белковому составу согласно исследованию, проведенному с целью изучения их первичной, вторичной и третичной структуры, сравниваемой с исходным вариантом. Важно отметить, что отношение концентрации липидов/концентрации белков не изменилось ни для одного из исследуемых вариантов. Тот же результат был получен с процентной долей общего содержания фосфолипидов относительно общего содержания белка. Никакие другие существенные изменения не были зарегистрированы в ходе анализа примесей HBsAg или других минорных соединений в результате анализа их состава с помощью масс-спектрометрии.

Пример 3. Иммунологическая оценка препаратов HBsAg, содержащих различные процентные доли фосфатидилсерина.

С целью оценки, влияет ли присутствие фосфатидилсерина на иммунный ответ против HBsAg, проводили исследование иммуногенности на трансгенных мышях, которые экспрессировали HBsAg в сыворотке [Castro FO, et al., *Interferon у Biotecnologia* (1989) 6:251-257; Perez A, et al., *Acta Biotechnol* (1993) 13:373-383]. Использовали семь групп по шесть мышей в каждой. Самок мышей возрастом 8-12 недель иммунизировали интраназальным путем (и/н). Первые шесть исследуемых групп получали по 5 мкг различных вариантов HBsAg, описанных в табл. 3, с адьювантом Фрейнда. Седьмая группа использовалась в качестве контрольной группы и получала PBS 1x. Все группы лечения получали 10 доз иммуногена, который вводили раз в 14 дней. Забор крови проводили перед первичной иммунизацией и через 10 дней после каждой дозы, начиная с третьей дозы. В табл. 4 показаны уровни HBsAg в крови трансгенных мышей, а также уровни цитокинов (IFN гамма (IFN-γ), фактора некроза опухоли (ФНО-α) и IL-2, индуцированных в супернатантах культур спленоцитов, выделенных после введения 10 доз. Анализ проводили при использовании методики ИФА.

После введения 5 мкг HBsAg и/н путем в 10 последовательных иммунизациях, концентрация HBsAg в крови трансгенных мышей по HBsAg была значительно снижена, когда уровень фосфатидилсерина в указанном HBsAg составлял 5% или больше (варианты D, E и F в табл. 3, пример 2). Аналогичным образом, варианты HBsAg, содержащие 5% или больше фосфатидилсерина, индуцировали значительно более высокие уровни IFN-γ, TNF-α и IL-2 по сравнению с вариантами с низкими (вариант C) или неподдающимися обнаружению уровнями фосфатидилсерина, что указывает на дозозависимый эффект. Это можно видеть в табл. 4.

При сравнении с HBsAg, который не содержит фосфатидилсерин, наблюдали значимое увеличение цитокинов Th1, при этом более высокая способность к элиминации циркулирующего HBsAg была обнаружена после иммунизации трансгенных мышей HBsAg вариантами HBsAg, содержащими уровни фосфатидилсерина больше 5% (табл. 4, варианты D-F). Уровни цитокинов, которые были обнаружены для вариантов D-F, были значительно выше, чем при условиях A-C. Варианты D-F индуцировали наибольшее снижение концентрации HBsAg, а также наиболее активную секрецию цитокинов после *in vitro* стимуляции клеток селезенки у иммунизированных трансгенных животных.

Таблица 4. Оценка циркулирующего HBsAg и уровней цитокинов после иммунизации трансгенных мышей вариантами HBsAg с разным процентным содержанием фосфатидилсерина

Вариант HBsAg	% снижения концентрации HBsAg	Секреция IFN-γ (пг/мл)	Секреция ФНО-α (пг/мл)	Секреция IL-2 (пг/мл)

A	20±3	50±7	37±6	14±6
B	23±4	65±12	45±18	22±4
C	26±5	149±15	200±26	36±7
D	66±5 (*)	250±20 (*)	570±30 (*)	50±5 (*)
E	70±6 (*)	300±27 (*)	660±27 (*)	77±8 (*)
F	90±5 (**)	359±31 (**)	750±37 (**)	90±10 (**)

A-F: варианты HBsAg, полученные с повышающимися уровнями фосфатидилсерина в своем составе, показанные в табл. 3,

(*): значимые различия ($p < 0,05$),

(**): высокочисленные различия ($p < 0,01$).

Наблюдали значимое увеличение цитокинов Th1 и более высокую способность к элиминации циркулирующего HBsAg при иммунизации мышей, которые были трансгенными по HBsAg, вариантами HBsAg, имеющими более высокое содержание фосфатидилсерина, что продемонстрирует увеличение иммуногенности антигена при увеличении процентной доли данного липидного компонента в липидах, связанных с VLP, формируемых этим антигеном.

О введении фосфатидилсерина в частицы HBsAg ранее сообщалось в уровне техники. Однако не было исследовано, каким образом процентная доля этого компонента влияет на иммуногенность указанных частиц. Хотя в 2008 году Лобайна с соавт. обсуждали роль фосфатидилсерина в более высокой иммуногенности HBsAg, продуцируемого в *P. pastoris* [Lobaina Y, et al., Applied Biotechnology (2008), 25:325-331], в том же сообщении было продемонстрировано, что две вакцины на основе HBsAg, полученные в том же хозяйстве, отличались по иммуногенности, хотя уровни фосфатидилсерина предположительно были одинаковыми, из-за вида дрожжей, в которых они были получены.

Пример 4. Демонстрация повышения иммуногенности у больных ХГВ вариантов HBsAg, содержащих более высокую процентную долю инкапсулированной мРНК.

В примере 1 было показано на мышах, что присутствовало увеличение иммуногенности HBsAg при увеличении процентной доли мРНК в общем количестве инкапсулированной РНК. С учетом таких результатов, исследовали иммунологические свойства и противовирусный ответ *in vivo* композиций, включающих HBsAg и HBsAg, с модификациями в отношении их мРНК и фосфатидилсерина, соответственно.

С этой целью проводили рандомизированное двойное слепое клиническое исследование фазы II у хронических больных гепатитом В. В начале исследования отбирали пациентов с вирусной нагрузкой выше 10000 копий/мл и положительным HBeAg. Пациентов распределяли в 6 групп по 15 пациентов, которым назначали лечение, описанное в табл. 5. В общей сложности вводили 10 доз, которые были разделены на два курса по 5 доз каждый, с интервалом один месяц между ними. Первые 5 доз вводили только и/н путем, а остальные 5 доз вводили одновременно и/н и п/к. В обоих курсах введения дозы вводили с интервалом 14 дней.

Таблица 5. Группы лечения в клиническом исследовании фазы II, в котором проводили оценку антигенов HBsAg и HBsAg с модификациями по содержанию мРНК и фосфатидилсерина, соответственно

Группы	Лечение
1	50 мкг мHBsAg+50 мкг мHBcAg
2	100 мкг мHBsAg+100 мкг мHBcAg
3	1000 мкг мHBsAg+1000 мкг мHBcAg
4	50 мкг HBsAg+50 мкг HBcAg
5	100 мкг HBsAg+100 мкг HBcAg
6	1000 мкг HBsAg+1000 мкг HBcAg

mHBcAg: HBcAg, содержащий мРНК с процентной долей 50% от суммарной РНК этого антигена,

mHBsAg: HBsAg, содержащий 7% фосфатидилсерина от липидных компонентов VLP.

Неожиданно, значительно более высокие уровни сероконверсии в HBeAg и HBsAg были обнаружены в группе пациентов, получавших препарат, содержащий оба модифицированных антигена (т.е. препарат, который содержал HBsAg с уровнями фосфатидилсерина больше 5% и HBcAg с мРНК больше 45%), по сравнению с группами пациентов, получавших препараты без этих характеристик (см. табл. 6). Это демонстрирует значимость таких изменений для улучшения качества противовирусного ответа, который был вызван у пациентов.

У людей антигены оценивали в диапазоне концентраций от 50 мкг каждого антигена на дозу до 1000 мкг каждого антигена на дозу, с подтверждением противовирусного ответа, в отношении сероконверсии в HBsAg и HBeAg, вирусологического контроля и долговременного вирусологического ответа до 10000 копий ДНК ВГВ в мл в течение более 1 года после завершения лечения.

Таблица 6. Доля пациентов с сероконверсией в HBeAg и HBsAg через год после завершения лечения в клиническом исследовании фазы II с HBeAg и HBsAg, имеющими модификации по содержанию мРНК и фосфатидилсерина, соответственно

Группы лечения	Сероконверсия в HBeAg	Сероконверсия в HBsAg
1	6/15	2/15
2	7/15	3/15
3	12/15	6/15
4	3/15	0/15
5	3/15	0/15
6	4/15	0/15

Подобные результаты также были получены в модели на мышах, которые были трансгенными по HBsAg, где исследование проводили для оценки таких же групп лечения, как описанные в табл. 5, при этом было получено большее уменьшение циркулирующего HBsAg, а также более высокие титры антител против HBsAg и с более ранним появлением, для групп, получающих композиции, которые содержали антигены с модификациями, описанными выше.

Примечательно, что композиции, содержащие варианты модифицированных HBeAg и HBsAg, развивали более высокую Th1 иммуногенность у мышей, трансгенных по ВГВ, и у пациентов по сравнению с реакцией, полученной с композициями, содержащими немодифицированные антигены, или композициями, которые содержали только один из этих модифицированных антигенов.

Пример 5. Адьювантный эффект антигенов HBeAg и HBsAg, имеющих модификации по содержанию мРНК и фосфатидилсерина, соответственно, в поливалентных композициях.

В этом исследовании сравнивали адьювантную способность, т.е. усиление иммунного ответа против антигенов, которые вводили совместно, в смеси рекомбинантных белков HBeAg и HBsAg с модификациями по содержанию мРНК и фосфатидилсерина, соответственно, со смесью немодифицированных HBeAg и HBsAg, парентеральным и мукозальным путями. Для этой цели был выбран рекомбинантный химерный белок CR3, который является мультиэпитопным антигеном ВИЧ-1 [Iglesias E et al., J Biochem Mol Biol & Biophys (2001) 1:109-122]. В восьми группах по восемь самок мышей Balb/c (H-2^d) возрастом 6-8 недель вводили:

- 1) PBS (плацебо) путем п/к иммунизации (далее именуемый плацебо (п/к));
- 2) натрий-ацетатный буфер (NaAc), pH 5,2, путем и/н иммунизации (плацебо (и/н));
- 3) смесь HBcAg (C) и HBsAg (S) п/к (C+S (п/к));
- 4) смесь HBcAg, содержащего мРНК в процентной доле 50% от суммарной РНК данного антигена (mC), и HBsAg, содержащего 7% фосфатидилсерина от липидных компонентов (mS) п/к (mC+mS (п/к));
- 5) C+S и/н (C+S (и/н));
- 6) mC+mS и/н (mC+mS (и/н));
- 7) смесь CR3 с HBcAg (C) и HBsAg (S) п/к (CR3+C+S (п/к));
- 8) CR3+mC+mS (п/к);
- 9) CR3+C+S (и/н) и
- 10) CR3+mC+mS (и/н).

Используемая доза составляла 5 мкг каждого антигена на каждый путь введения, при этом иммуногены вводили в дни 0, 7 и 21 схемы иммунизации. Для п/к иммунизации белки растворяли в PBS и адсорбировали в 1,4 мг/мл гидроксида алюминия (Superfos Biosector A/S, Vedbaek, Denmark). Для и/н пути белки растворяли в NaAc, pH 5,2. Животным, помещенным в положение лежа на спине, делали анестезию путем внутрибрюшинного (в/б) введения 30 мкг кетамина (10 мг/мл) и медленно вводили иммуногены в 50 мкл (25 мкл/в ноздрю) через наконечник пипетки. Через десять дней после иммунизации сыворотку всех животных собирали и пять животных умерщвляли (случайным образом) в конце исследования для получения их селезенки для исследований клеточного иммунного ответа.

Продукцию IgG в сыворотке оценивали с помощью непрямого ИФА, в котором планшеты были покрыты белком CR3. Методика количественного анализа секреции IFN- γ в супернатантах культур, стимулируемых с CR3, была описана ранее [Garcia Diaz D et al., Immunol Lett (2013) 149:77-84].

Распределение Гаусса оценивали для статистического анализа данных с использованием критерия Колмогорова-Смирнова и равенства дисперсий с критерием Бартлетта. Образцы с нормальным распределением (или такие, в которых определяли распределение Гаусса) и с равной дисперсией сравнивали с параметрическими критериями; в противном случае использовали альтернативный непараметрический критерий. Все титры IgG были преобразованы в log 10 для получения нормального распределения значений. Сывороткам животных, которые не достигали сероконверсии, присваивали произвольный титр 1:10 для статистической обработки. Значение $p < 0,05$ считали статистически значимым.

Результаты определения IgG антитела против CR3 (ВИЧ-1), наблюдаемого на фиг. 2, показали более высокий ответ ($p < 0,05$) после введения п/к и и/н путями в группах животных, иммунизированных смесью CR3+mC+mS (группы 8 и 10) в сравнении с CR3+C+S (группы 7 и 9), соответственно. В соответ-

ствии с предыдущими результатами более высокую секрецию IFN- γ также наблюдали в супернатантах культур мышей в тех же группах, которые представлены в табл. 7. Для этого анализа через десять дней после последней иммунизации (день 31) культивировали спленоциты пяти мышей из каждой группы. Суспензии спленоцитов отдельных животных подготавливали для группы плацебо. Их стимулировали *ex vivo* 2,5 мкг/мл белка CR3 в течение пяти дней. В супернатантных жидкостях CR3-специфический IFN- γ определяли количественно с помощью ИФА сэндвич-типа. Предел обнаружения составлял 0,80 нг/мл.

Таблица 7. Секреция IFN- γ , измеренная в супернатантных жидкостях культур

Группа	Инокулят	Повторность (мышь)	IFN- γ (нг/мл)
1	Плацебо (п/к)	Пул	<0,80
2	Плацебо (и/н)	Пул	<0,80
3	C+S (п/к)	1	<0,80
		2	<0,80
		3	<0,80
		4	<0,80
		5	<0,80
4	mC+mS (п/к)	1	<0,80
		2	<0,80
		3	<0,80
		4	<0,80
		5	<0,80
5	C+S (и/н)	1	<0,80
		2	<0,80
		3	<0,80
		4	<0,80
		5	<0,80
6	mC+mS (и/н)	1	<0,80
		2	<0,80
		3	<0,80
		4	<0,80
		5	<0,80
7	CR3+C+S (п/к)	1	6,35
		2	7,86
		3	3,32
		4	4,45
		5	3,54
8	CR3+mC+mS (п/к)	1	10,35
		2	9,86
		3	8,62
		4	9,05
		5	11,24
9	CR3+C+S (и/н)	1	<0,80
		2	2,03
		3	1,68
		4	0,97
		5	2,25
10	CR3+mC+mS (и/н)	1	4,55
		2	5,36
		3	3,87
		4	2,54
		5	3,98

Наконец, процент CD8⁺ клеток, которые являются специфическими к CR3 (ВИЧ-1), сравнивали после *ex vivo* стимуляции в группах, иммунизированных п/к путем. Более высокий процент CD8⁺ клеток был получен в группе, стимулируемой CR3+mC+mS (п/к) в сравнении с CR3+C+S (п/к) ($p < 0,05$), что можно наблюдать на фиг. 3.

Эти результаты в целом показывают, что смесь HBsAg, содержащего мРНК выше 45% (mC), и HBsAg с уровнями фосфатидилсерина выше 5% (mS) проявляет более сильный Th1 адьювантный эффект при введении парентеральным и мукозальным путями. В частности, в случае вакцинации против ВИЧ, этот результат крайне важен, поскольку противовирусный Th1 ответ связывали с защитой от инфекции и прогрессирования в СПИД.

Хотя целью этого эксперимента не было измерение гуморального ответа против антигенов HBsAg и HBcAg (сокращенно обозначенных в данном примере как C и S), наблюдали ответы IgG против HBsAg и против HBcAg, которые были более высокими и статистически значимыми, в группах мышей, иммунизированных смесью модифицированных антигенов HBsAg и HBcAg (mC+mS), по сравнению со смесью немодифицированных HBsAg и HBcAg (C+S, данные не показаны). Это подтверждало приведенные выше результаты.

Пример 6. Пассивная иммунизация посредством адоптивного переноса клеток от мышей Balb/c, иммунизированных композициями HBsAg и HBsAg с модификациями по содержанию мРНК и фосфатидилсерина, соответственно, трансгенным мышам Balb/c, экспрессирующим HBsAg.

В этом изобретении авторы постарались усилить иммунный ответ против HBsAg и против HBcAg у доноров посредством активной иммунизации пациентов композицией, содержащей антигены HBsAg и HBcAg, которые включают модификации по содержанию фосфатидилсерина и мРНК, соответственно, и, кроме того, клетки, подлежащие переносу, будут активировать *in vitro* до переноса, поэтому ответ на эти антигены будет максимальным, когда клетки будут инокулировать в организм реципиента. Таким образом, тип ответа, который не существует у пациентов, получают искусственно, что позволяет расширить группу доноров до лиц с подобными гаплотипами, независимо от того, были ли они инфицированы ВГВ или нет.

В текущем примере с помощью адоптивного переноса клеток оценивали влияние иммунного ответа, вызванного в результате вакцинации с использованием композиции, состоящей из антигенов HBsAg и HBcAg с модификациями по содержанию фосфатидилсерина и мРНК, соответственно, которую применяли и/н/парентеральными путями, в отношении трансгенной мыши, которая экспрессирует HBsAg, модели персистентной инфекции ВГВ. Одной из целей исследования являлась оценка влияния перенесенного иммунного ответа на концентрацию HBsAg (антигенемия) в сыворотке трансгенной мыши. Кроме того, сравнивали влияние ответа, вызванного комбинацией и/н/парентерального путей при введении композиции антигенов HBsAg и HBcAg в сравнении с влиянием, вызванным переносом клеток, стимулируемых только HBsAg *in vivo* и *in vitro*. Кроме того, изучали кинетику перенесенной продукции антител против HBsAg в отношении трансгенной мыши для этого антигена. Использовали мышей Balb/c и мышей, которые были HBsAg (+) трансгенными (с генетическим фоном Balb/c, полученных в CIGB).

Получение мышей Balb/c с иммунитетом против HBsAg Курс иммунизации проводили на самках мышей Balb/c возрастом 8-12 недель. Мышей иммунизировали препаратом вакцины, содержащим модифицированные антигены HBsAg (с содержанием фосфатидилсерина больше 5%) и HBcAg (с содержанием мРНК больше 45%), одновременно и/н и парентеральными путями. В случае парентерального введения тестировали в/м, п/к и в/к пути. Дозу (в объеме 100 мкл) вводили в дни 0 и 14 и повторную иммунизацию делали в день 100 перед переносом. Забор крови делали из ретроорбитального сплетения в дни 2, 10 и 25. В табл. 8 показана схема иммунизации, включающая лечение, полученное каждой группой.

Таблица 8. Схема иммунизации у нетрансгенных мышей Balb/c

Группа	Лечение	Путь введения	Количество животных
1	mHBsAg+mHBcAg+квасцы/mHBsAg+mHBcAg	в/м/и/н	13
2	mHBsAg+mHBcAg+квасцы/mHBsAg+mHBcAg	п/к/и/н	13
3	mHBsAg+mHBcAg+квасцы/mHBsAg+mHBcAg	в/к/и/н	13
4	mHBsAg+mHBcAg/mHBsAg+mHBcAg	в/м/и/н	13
5	mHBsAg+mHBcAg/mHBsAg+mHBcAg	п/к/и/н	13
6	mHBsAg+mHBcAg/mHBsAg+mHBcAg	в/к/и/н	13
7	квасцы/PBS	в/м/и/н	9

mHBcAg: HBcAg, содержащий мРНК в процентной доле 50% от суммарной РНК данного антигена,

mHBsAg: HBsAg, содержащий 7% фосфатидилсерина от общего содержания липидных компонентов VLP.

Оценку иммунного гуморального ответа, полученного в результате лечения, проводили путем измерения продукции IgG и субклассов IgG против HBsAg, после каждой прививки, с помощью методики ИФА. Для оценки клеточного иммунного ответа, через 10 дней после первого введения, проводили исследование по типу ELISPOT, для измерения секреции специфического IFN- γ против HBsAg CD8+ лимфоцитами селезенки. Результаты этих оценок указывают, что группа 5 производит наиболее сильный клеточный ответ и гуморальный ответ, который не отличается от остальной части исследуемых групп. На основе этого отобрали двух животных из этой группы в качестве доноров спленоцитов для адоптивного переноса. Выбор иммуногена проводили при соотношении 1:1 (HBsAg:HBcAg)

Получение иммунных спленоцитов.

Через пятнадцать дней после получения бустерной иммунизации, двух мышей из группы 5 и трех мышей из группы 7 (плацебо) умерщвляли и забирали их селезенку. Селезенки из группы 5 и из группы 7, соответственно, группировали. Селезенки обрабатывали для получения спленоцитов. Их делили на аликвоты по 30×10^6 клеток в 100 мкл PBS 1 \times для переноса реципиентным мышам.

Адоптивный перенос иммунитета.

Трансгенные мыши, экспрессирующие HBsAg, которых использовали в качестве реципиентов, имели возраст 16-20 недель и были представлены обоими полами. Их распределяли в различные группы лечения, как показано в табл. 9. Перед переносом спленоцитов проводили частичный забор крови для проверки уровней HBsAg в сыворотке. Затем вводили (в/б путем) 30×10^6 спленоцитов в объеме 100 мкл PBS 1 \times . Забор крови для оценки эффекта адоптивного переноса иммунитета производили из ретроорбиталь-

ного сплетения раз в неделю в течение 5 недель. В неделю 8 после переноса у животных забирали кровь и умерщвляли.

Таблица 9. Схема эксперимента по адоптивному переносу иммунитета

Группа	Лечение	Количество животных
1	Перенос спленоцитов мышей Balb/c с ответом против HBsAg и HBeAg	3
2	Перенос спленоцитов мышей Balb/c из группы плацебо	3
3	PBS 1x	3

Количественный анализ HBsAg в сыворотке мышей, трансгенных по HBsAg.

Уровни HBsAg в сыворотке определяли с помощью ИФА. Планшеты покрывали моноклональным антителом против HBsAg, названным Her4 (производства SIGB). Все мыши, получавшие клетки с предыдущим иммунитетом к HBsAg, показали при оценке через неделю после переноса заметное уменьшение HBsAg в сыворотке, со значимыми различиями между нулевым моментом и 2-й и 3-й неделями ($p < 0,05$).

В четвертую неделю (день 35) заметили, что концентрации HBsAg в сыворотке начали увеличиваться, что указывало на то, что контроль антигенемии посредством перенесенного иммунитета снижается. С этого момента и до недели 8 (день 63) не наблюдали никаких различий в антигенемии, наблюдаемой в нулевой момент исследования.

В случае мышей, подвергнутых переносу спленоцитов со специфическим иммунитетом против HBsAg, обнаружили заметные снижения HBsAg в сыворотке, которые были наиболее заметными в дни 7-28. Однако мыши, которые получали плацебо перенос спленоцитов или PBS, хотя и имели изменения концентрации HBsAg в сыворотке, но они не достигали значимого различия с нулевым моментом, и значения ниже 5 мкг/мл никогда не регистрировали.

Эти результаты указывают, что с помощью адоптивного переноса иммунитета, опосредованного клетками, можно эффективно снизить уровни HBsAg, циркулирующего в сыворотке этих животных, трансгенных по этому белку. Контроль, установленный в отношении антигенемии иммунным ответом, перенесенным в данном случае, был эффективным и продолжался в течение приблизительно 3 недель после однократного переноса клеток.

Продукция IgG против HBsAg в сыворотке.

Специфичный гуморальный иммунный ответ IgG против HBsAg был обнаружен у всех мышей, подвергнутых переносу спленоцитов с предшествующим иммунитетом к этому антигену. Это согласуется с полученными результатами по антигенемии. У животных с ответом против HBsAg обнаруженные титры были высокими (титр $> 10^4$) и начинали снижаться в третью неделю, что может быть связано с повышением антигенемии, которое наблюдали у этих животных приблизительно в 4-ю неделю (день 35). Группы, подвергнутые переносу плацебо клеток или PBS, не показали наличия специфичных антител.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Фармацевтическая композиция, содержащая ядерный антиген вируса гепатита В (HBeAg) и поверхностный антиген вируса гепатита В (HBsAg), отличающаяся тем, что ядерный антиген вируса гепатита В (HBeAg) включает матричную рибонуклеиновую кислоту (мРНК) в процентной доле от 45 до 67,1% от общего количества рибонуклеиновой кислоты (РНК) этого антигена, и поверхностный антиген вируса гепатита В (HBsAg) включает фосфатидилсерин в количестве от 5 до 8,2% от общего количества фосфолипидов этого антигена.

2. Фармацевтическая композиция по п.1, отличающаяся тем, что она содержит пропорции антигенов 1:1 от концентрации белков.

3. Фармацевтическая композиция по п.1, отличающаяся тем, что она составлена для введения парентеральным и мукозальным путями.

4. Фармацевтическая композиция по п.1, отличающаяся тем, что она дополнительно включает адъювант вакцины.

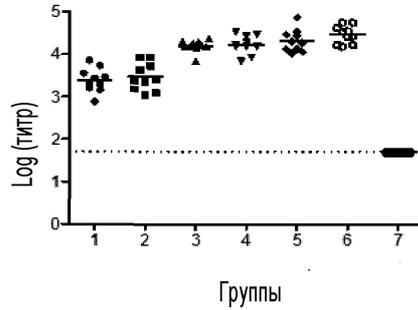
5. Применение фармацевтической композиции, которая содержит ядерный антиген вируса гепатита В (HBeAg), который включает матричную рибонуклеиновую кислоту (мРНК) в количестве от 45 до 67,1% от общего количества рибонуклеиновой кислоты (РНК) этого антигена, и поверхностный антиген вируса гепатита В (HBsAg), который включает фосфатидилсерин в количестве от 5 до 8,2% от общего количества фосфолипидов этого антигена, в получении лекарственного средства, предназначенного для применения в иммунной профилактике или иммунотерапии против инфекции, вызываемой вирусом гепатита В (ВГВ).

6. Применение по п.5, где лекарственное средство предназначено для введения парентеральным и мукозальным путями.

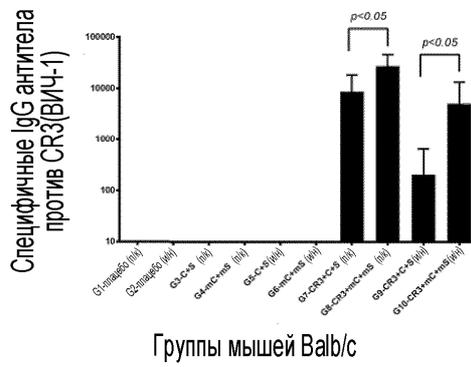
7. Применение по п.5, где лекарственное средство используют в лечении пациентов с хроническим гепатитом В (ХГВ) или пациентов с коинфекциями, где одним из инфицирующих вирусов является вирус гепатита В.

8. Применение по п.7, где лечение пациентов с ХГВ используют в предотвращении гепатоцеллюлярного рака, возникшего в результате инфекции, вызванной ВГВ.

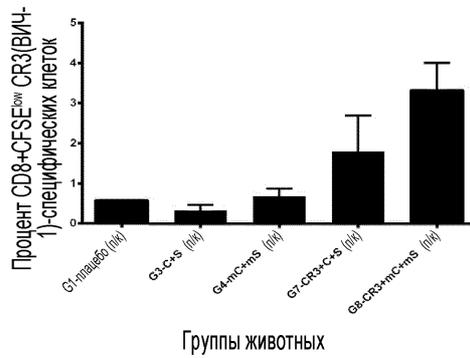
9. Применение по п.5, где иммунотерапию проводят в активной или пассивной форме путем клеточной стимуляции.



Фиг. 1



Фиг. 2



Фиг. 3

